

组织工程用真皮成纤维细胞渗透特性的初步研究

王欣, 华泽钊*, 杨光辉¹, 崔磊¹, 刘伟¹, 曹谊林¹, 程启康

(上海理工大学低温生物医学与技术研究所, 上海 200093; ¹上海市组织工程研究与开发中心, 上海 200235)

摘要: 在优化组织工程化真皮低温保存程序时, 需要了解体外培养的真皮成纤维细胞的渗透特性。利用细胞计数与尺寸分析仪初步研究了组织工程用真皮成纤维细胞对水的渗透特性, 其中包括细胞的等渗体积、细胞在低渗或高渗溶液(渗透压范围: 130~1250 mOsm)中细胞的平衡体积及细胞的不可渗体积。结果表明, 在等渗条件下(280.67 mOsm), 真皮成纤维细胞的平均体积为 $5105.51\mu\text{m}^3$ (直径 $d = 21.40\mu\text{m}$); 细胞体积随溶液渗透压的变化规律符合 Boyle van't Hoff 关系式, 据此得到真皮成纤维细胞的不可渗体积 $V_b = 0.3631V_i$, 为 $1853.81\mu\text{m}^3$ 。

关键词: 渗透特性; 组织工程; 真皮; 成纤维细胞

中图分类号: Q27 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-301-04

组织工程化真皮是包含有活细胞的真皮替代物。无论细胞的体外扩增, 还是细胞与支架材料的复合培养都有一定的周期性; 而且随培养时间的延长, 支架材料会逐渐降解, 使组织工程化真皮失去可利用性。因此, 有必要对组织工程化真皮进行低温保存(Cryopreservation), 以保持细胞的活性和组织结构的完整性, 最大限度地满足临床治疗烧伤的不时之需, 缓和供需矛盾。

虽然目前关于组织工程化真皮的低温保存方法正在进行研究, 并已取得一定的进展^[1]。但为了对其冻结过程进行定量分析, 以提高低温保存的存活率, 有必要对组织工程化真皮中的成纤维细胞对水分的渗透特性进行实验测定。

细胞渗透特性的研究常借助显微技术和图像分析技术来实现^[2]。这种方法可获得细胞的静态体积和体积的动态变化, 其优点是需要的细胞量少, 但缺点是得到的是细胞的投影面积、图像分析耗时长、且受分辨率的限制。近年来有些研究者利用细胞计数与尺寸分析仪测定细胞渗透特性的研究表明, 细胞计数与尺寸分析仪测定细胞的渗透特性时不受细胞形状的限制, 测量准确、快速, 重复性高, 结果可靠^[3]。细胞计数与尺寸分析仪采用库尔特原理(Coulter Principle), 其电位差变化的幅度与细胞体积大小成正比, 细胞所产生的脉冲再经放大、测量、记录, 可以显示细胞数目及细胞的平均体积。

关于中国仓鼠的成纤维细胞的渗透特性已有研究报告^[4,5], 但尚未见有关组织工程化真皮成纤维细胞渗透特性的研究报告, 因此, 本文利用细胞计数与尺寸分析仪对体外培养用于构建组织工程化真皮的人真皮成纤维细胞的渗透特性进行了实验测定与分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人真皮成纤维细胞, 由上海市组织工程研究与开发中心提供。

1.2 仪器设备

细胞计数与尺寸分析仪(Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer, BeckmanCoulter Inc.), 渗透压计(FM-8P 全自动冰点渗透压计, 上海医科大学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 高渗及低渗溶液的准备 等渗溶液: 以在真皮成纤维细胞分离、消化等过程中常用的磷酸氢钾缓冲液(pH7.2, 其中, NaCl 0.137mol/L, KCl 0.003mol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01mol/L, KH_2PO_4 0.001mol/L)看作等渗溶液, 以渗透压计测得的毫渗

收稿日期: 2003-09-26; 修回日期: 2003-11-14

国家自然科学基金重点项目(59836240), 973项目(G1999054309), 863项目(2002AA205041), 上海市重大科技攻关项目(00DJ14001-6), 上海市教委重点学科建设项目。

* 通讯作者, E-mail: tchua@sh163.net

量为: 280.67mOsm。

通过向等渗的 PBS 溶液中添加不同量的蔗糖或蒸馏水调节其渗透压。具体添加量如下:

低渗溶液系列中, 以配制 500ml 低渗溶液为例, 需分别添加蒸馏水的量(ml)为: 267、206、170、118。

高渗溶液系列中, 以配制 500ml 低渗溶液为例, 需分别添加蔗糖的量(g)为: 20、62、72、92、166。

利用渗透压计测量实际的渗透压。用 0.22 μ m 滤膜过滤备用。

1.3.2 细胞悬液的制备 取体外培养、生长正常的组织工程化真皮用成纤维细胞, 除去培养液, 加入约 10ml 的 PBS, 冲洗残留的血清 2~3min, 再除去 PBS, 加入 1.5ml 的 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 同时在显微镜下观察, 见细胞变圆、彼此分开后, 终止消化。用弯管轻轻刮下皿壁上的细胞, 然后用吸管移入离心管中, 1000r/min 离心 5min, 除去上清液, 再吹打并加入 PBS 制成细胞浓度约为 2×10^7 个/ml 的细胞悬液。

1.3.3 细胞等渗体积(V_i)的测量 取 400 μ l 制备好的细胞悬液加入细胞计数与尺寸分析仪的试样杯中(试样杯中已有 20ml 的等渗的 PBS 溶液), 在室温条件下平衡 10min 后, 测量细胞的平均体积(MCV), 重复 6 次, 取平均值。

1.3.4 非等渗条件下细胞体积的变化 将细胞计数与尺寸分析仪系统中的溶液排空后, 用待测的非等渗溶液充满并清洗细胞计数与尺寸分析仪数次后, 取 400 μ l 制备好的细胞悬液加入细胞计数与尺寸分析仪的试样杯中(试样杯中已有 20ml 的非等渗溶液), 在室温条件下平衡 10min 后, 测量细胞的平均体积(MCV), 重复 6 次, 取平均值。

1.4 细胞不可渗体积(V_b)的确定^[6]

设成纤维细胞的渗透特性符合 Boyle Van't Hoff 关系式, 即:

$$\frac{V}{V_i} = \frac{M_i}{M} \left(1 - \frac{V_b}{V_i} \right) + \frac{V_b}{V_i}$$

其中, V_i : 细胞在等渗条件下的体积(μm^3); V : 细胞在不同渗透压条件下的体积(μm^3); V_b : 细胞的不可渗体积(μm^3); M_i : 等渗溶液的渗透压, 用毫渗透量浓度表示(mOsm); M : 非等渗溶液的渗透压(mOsm)。

根据此关系式, V/V_i 与 M_i/M 存在正比关系, 对实验测得的数据以此关系作图, 并进行线性拟合(最小二乘法), 可获得细胞的不可渗体积(V_b)。

GAO等(1998)及CHARLES等(2003)利用此关系式对在渗量范围分别为 163~1505 mOsm 和 140~1800mOsm 时获得的骨髓 CD34⁺ 细胞和脐带血 CD34⁺ 细胞的体积变化进行了线性拟合, 得到了细胞的不可渗体积^[3,6]。

2 结果与分析

2.1 溶液渗透压的确定

对配制好的等渗及非等渗溶液的渗透压以渗透压计测量结果如表 1 所示。

表 1 中, 系列 5 为等渗 PBS 溶液, 其毫渗量为 280.67 mOsm。本次试验的渗透压范围为 130~1250 mOsm。

表 1 实验用溶液的渗透压实测值

系列	检测值(mOsm)			平均值(mOsm)	STD
1	131	129	132	130.67	1.25
2	163	168	165	165.33	2.05
3	185	186	185	185.33	0.47
4	213	216	215	214.67	1.25
5*	281	281	280	280.67	0.47
6	418	419	418	418.33	0.47
7	641	647	648	645.33	3.09
8	806	808	805	806.33	1.25
9	964	969	966	966.33	2.05
10	1213	1192	1344	1249.67	67.25

*, 等渗 PBS 溶液。

表 2 成纤维细胞在等渗条件下的细胞几何参数

渗透压(M_i) mOsm	体积(V_i) μm^3	相当直径(d) μm	相当表面积(A_c) μm^2	A_c/V_i 1/ μm
280.67	5105.51	21.37	1433.97	0.28

表 3 成纤维细胞在不同溶液中的平衡体积实测值

系列	渗透压(mOsm)	平均每次检测细胞数(个)	细胞平均体积(MCV)(μm^3)	STD
1	130.67	1101	6687.28	128.31
2	165.33	1782	6454.88	104.06
3	185.33	1202	6440.59	167.25
4	214.67	1266	5167.16	85.58
5*	280.67	1285	5105.51	105.43
6	418.33	1562	3908.54	56.10
7	645.33	1627	2820.14	77.84
8	806.33	1084	2589.17	66.33
9	966.33	1576	2313.94	73.17
10	1249.33	1165	2204.42	118.96

*, 等渗 PBS 溶液。

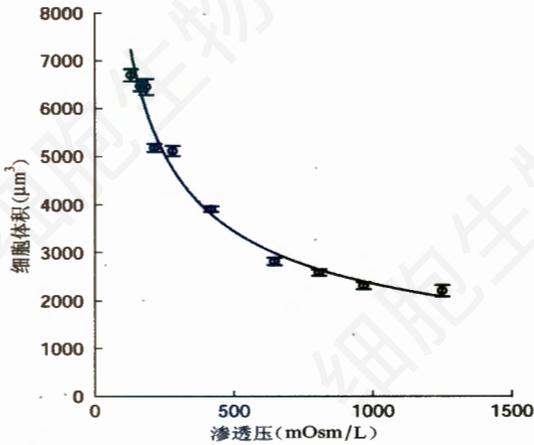


图1 不同渗透压下成纤维细胞的平衡体积

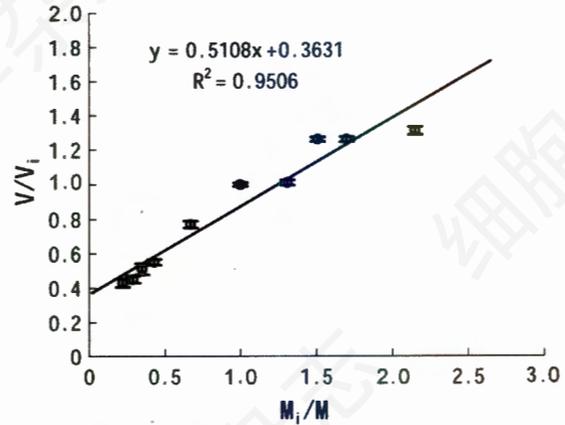


图2 成纤维细胞不可渗体积(V_b)的确定(Boyle van't Hoff 关系式)

表4 不同细胞的几何参数及不可渗体积

细胞种类	M_i mOsm	体积(V_i) μm^3	表面积(A_c) μm^2	直径(d) μm	不可渗体积(V_b) μm^3	V_b/V_i	检测方法
人体真皮成纤维细胞	280.67	5105.51	1433.70	21.40	1853.81	0.36	细胞计数与尺寸分析仪
V-79W 中国仓鼠成纤维细胞 ^[5]	300	724.00	389.86	11.14	325.80	0.45 ^[4]	低温显微镜
骨髓 CD34 ⁺ ^[3]	325	289.00	211.00	8.20	59.25	0.205	细胞计数与尺寸分析仪
脐带血 CD34 ⁺ ^[6]	295	274.00	203.99	8.06	73.98	0.27	细胞计数与尺寸分析仪
EBVT 淋巴细胞 ^[7]	未给出	696.56	379.94	11.00	181.11	0.26	低温显微镜
人类精子细胞 ^[8]	282	22.20	106	0.84	5.11	0.23	低温显微镜
小鼠精子细胞 ^[9]	285	81.00	353.00	0.92	49.41	0.61	低温显微镜
大鼠胚泡细胞 ^[10]	290	220781.25	17662.50	75.00	66234.38	0.3	低温显微镜

2.2 成纤维细胞的等渗体积(V_i)

在等渗条件下平衡 10min 后, 测得的细胞的平均体积, 据此求得细胞的相当直径、相当表面积及相当表面积与细胞体积之比如表 2 所示。

2.3 不同渗透压下细胞的平衡体积

在上述渗透压条件下, 利用细胞计数与尺寸分析仪测量到的成纤维细胞在各渗透压下的平衡体积如表 3 及图 1 所示。

图 1 表明: 随溶液渗透压的增加, 细胞体积缩小。从表 3 也可以看出, 渗透压小于 645.33 mOsm/L 时, 细胞体积缩小较为明显; 而当渗透压大于 645.33 mOsm/L 时, 细胞的体积变化较小。

2.4 细胞不可渗体积(V_b)的确定

根据 Boyle van't Hoff 关系式, 对所获得的实验数据作图, 并进行线性拟合(最小二乘法), 结果见图 2。

由图 2 可知, 经直线拟和后, 直线在 y 轴上的截距为 0.3631, 即: $V_b=0.3631V_i$ 。细胞的不可渗体积为 $1853.81\mu\text{m}^3$ 。

表 4 比较了本实验中得到的人体真皮成纤维细胞和其他几种细胞的几何参数和不可渗体积(V_b)。

由表 4 可以看出, 从细胞大小来比, 人体真皮成纤维细胞的体积较仓鼠成纤维细胞、CD34⁺、淋巴细胞及精子细胞大, 而比大鼠胚泡细胞小。细胞的不可渗体积与细胞的大小无关, 只与细胞种类有关。Gao 等(1998)对骨髓 CD34⁺ 渗透特性的研究表明, 低温显微镜法和细胞计数与尺寸分析仪法获得的细胞渗透特性的结果具有可比性^[3]。虽然人体真皮成纤维细胞的体积比 V-79W 中国仓鼠成纤维细胞体积大, 但其细胞的不可渗体积明显较小, 为等渗体积的 36%。

在获得人体真皮成纤维细胞的体积及细胞的不可渗体积的基础上, 可利用差示扫描量热技术(differential scanning calorimetry, DSC)研究在有胞外冰及有低温保护剂时, 真皮成纤维细胞体积在降温冻结过程中的动态变化, 并结合一定的水分渗透模型, 从而获得细胞膜对水分或低温保护剂的渗透系数及相应的表观活化能等参数。利用这些参数可对低温保护剂的添加及去除过程进行优化, 有利于提高组织工程化真皮低温保存的效果。

3 讨论

参 考 文 献

- [1] 王欣, 华泽钊, 杨光辉等. DMSO浓度及降温速率对组织工程化真皮超低温保存效果的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2003, 25(5): 310 - 314.
- [2] 华泽钊, 任禾盛. *低温生物医学技术*. 北京: 科学出版社, 1994.
- [3] GAO D Y, CHANG Q, LIU C, *et al.* Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitor cells I: Osmotic characteristics and volume distribution [J]. *Cryobiology*, 1998, 36: 40 - 48.
- [4] MULDREW K. Doctoral Dissertation [M]. University of Alberta, Canada, 1993.
- [5] ELMOAZZEN H Y, ELLIOT J A W, MCGANN L E. The effect of temperature on membrane hydraulic conductivity [J]. *Cryobiology*, 2002, 45: 68 - 79.
- [6] CHARLES J H, SUSAN E A, DAVID E P. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34+ cells to dimethyl sulphoxide [J]. *Cryobiology*, 2003, 46: 61 - 75.
- [7] RAMACHANDRA V D, DEBOPAM R, JOHN C B. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter [J]. *Cryobiology*, 1998, 36: 124 - 155.
- [8] RAMACHANDRA V D, DAVID J S, KENNETH P R, *et al.* The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing [J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(5): 1125 - 1135.
- [9] RAMACHANDRA V D, DAVID J S, KENNETH P R, *et al.* Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents [J]. *Biology of Reproduction*, 1999, 61: 764 - 775.
- [10] IGOR I K. The point of maximum cell water volume excursion in case of presence of an impermeable solute [J]. *Cryobiology*, 2002, 44: 193 - 203.

A Primary Study on the Water Osmotic Characteristics of Fibroblasts Employed in Tissue Engineered Dermal Replacement

WANG Xin, HUA Ze Zhao*, YANG Guang Hui¹, CUI Lei¹, LIU Wei¹, CAO Yi Lin¹, CHENG Qi Kang

(*Institute of Cryomedicine, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, China; ¹Shanghai Tissue Engineering Research & Development Center, Shanghai 200235, China*)

Abstract: To predict optimal protocols for cryopreservation of tissue engineered dermal equivalent, knowledge of fundamental cell water osmotic characteristics is required. In this study, the osmotic characteristics of cultured dermal fibroblasts were investigated using Coulter particle count and size analyzer. The normal cell volume is $5105.51\mu\text{m}^3$ ($d = 21.40\mu\text{m}$) measured at initial (isotonic) osmolality, 280.67 mOsm. The cell volume changes were measured after the cells were exposed and equilibrated to different anisosmotic conditions. The cell volume was found to be a linear function of the reciprocal of the extracellular osmolality (Boyle van't Hoff plot) ranging from 130 to 1250 mOsm. The non-osmotic volume of the dermal fibroblast is 0.36 of the cells isotonic volume.

Key words: osmotic characteristics; tissue engineering; dermis; fibroblast

This work was supported by National Natural Science Foundation of China(59836240), National 973 project of China(G1999054309), National 863 project of China(2002AA205041), Key Technologies R & D Project of Shanghai(00DJ14001-6), and Key Subject Construction Project of Shanghai Municipal Education Commission

*Corresponding author, E-mail: tchua@sh163.net